

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



## ⑫ 公開特許公報(A) 平3-49688

⑮ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)3月4日

C 12 P 7/40  
//C 12 P 7/40  
C 12 R 1:645)

6742-4B

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全5頁)

⑭ 発明の名称 ジホモ-γ-リノレン酸の製造法および脂肪酸のΔ5位不飽和化反応抑制剤

⑰ 特 願 平1-183789

⑱ 出 願 平1(1989)7月18日

⑲ 発 明 者 中 島 寿 昭 千葉県君津郡袖ヶ浦町上泉1660番地 出光石油化学株式会社内

⑳ 出 願 人 出光石油化学株式会社 東京都千代田区丸の内3丁目1番1号

㉑ 代 理 人 弁理士 久保田 藤郎

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

ジホモ-γ-リノレン酸の製造法および  
脂肪酸のΔ5位不飽和化反応抑制剤

## 2. 特許請求の範囲

(1) ジホモ-γ-リノレン酸生産能を有する微生物を、クルクミンを添加した培地で培養し、培養物からジホモ-γ-リノレン酸を採取することを特徴とするジホモ-γ-リノレン酸の製造法。

(2) クルクミンを主成分とする脂肪酸のΔ5位不飽和化反応抑制剤。

## 3. 発明の詳細な説明

## (産業上の利用分野)

本発明はジホモ-γ-リノレン酸(Δ8, 11, 14エイコサトリエン酸)を発酵法により安価に大量生産する方法および微生物や動物細胞の脂肪酸に対するΔ5位不飽和化反応抑制剤に関する。

## (従来の技術および発明が解決しようとする課題)

ジホモ-γ-リノレン酸を生産する方法として、グルコースを主原料とする培地にゴマ油を添加し

てモルティエラ属微生物を培養することにより、ジホモ-γ-リノレン酸を含む脂質を生産する方法が知られている(H. Yamada, et al., J. Am Oil Chem. Soc., Vol 66, p237~241(1989))。

また、脂肪酸のΔ5位不飽和化反応抑制剤としては、ゴマ油中のセサミン、エビセサミンが知られている(H. Yamada, et al., 日本農芸化学会誌63巻, p676(1989))。しかしながら、セサミンやエビセサミンの純品を大量に採ることはコスト的に高く、実用性に劣るという欠点があった。

## (課題を解決するための手段)

そこで、本発明者らはジホモ-γ-リノレン酸の発酵法による大量生産について鋭意研究した結果、特定の化合物を培地に添加することにより目的を達成できること、並びに該化合物が脂肪酸のΔ5位不飽和化反応を抑制する作用を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明はジホモ-γ-リノレン酸生産能を有する微生物を、クルクミンを添加した培地で培養し、培養物からジホモ-γ-リノレン酸

を採取することを特徴とするジホモ-γ-リノレン酸の製造法、およびクルクミンを主成分とする脂肪酸のΔ5位不飽和化反応抑制剤を提供するものである。

本発明で使用する微生物は、ジホモ-γ-リノレン酸生産能を有するものであればよく、例えばコニディオボラス属やモルティエラ属に属するジホモ-γ-リノレン酸生産能を有する微生物を挙げることができる。具体的には、コニディオボラス・ナノデス(*Conidiobolus nanodes*) CBS 183/62、コニディオボラス・ランブラウジェス(*Conidiobolus lamprauges*) ATCC 12585、モルティエラ・アルピナ(*Mortierella alpina*) IFO 8568等が挙げられる。

本発明では、上記微生物を培養してジホモ-γ-リノレン酸を製造するための培地に、クルクミンを含むことが必須である。クルクミンはウコンに含まれる黄色色素の主成分であり、入手が容易である上に、純品も安価で手に入る。ウコンはカレー粉、たくあん、漬物等の着色料として用いられており、その安全性にも問題はない。培地に添

られる。また、窒素源としては酵母エキス、ペプトン、大豆粕などの有機窒素源が好ましく、無機塩類としてはリン酸カリウム( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、鉄塩( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )、マグネシウム塩( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )、亜鉛塩( $\text{ZnSO}_4$ )などが用いられる。その他、必要に応じて微量元素や栄養源を添加することもできる。

上記微生物の培養は通常、液体培地にて振とう培養や通気攪拌培養などにより行なわれる。培養条件は培養温度10～40℃、好ましくは20～30℃、培養日数は1～20日であり、コニディオボラス属に属する微生物を用いる場合は3～10日が好ましいが、これらの条件は用いる微生物の性質等を考慮してジホモ-γ-リノレン酸の生産量が高くなるように設定すればよい。

このようにして培養物中にジホモ-γ-リノレン酸が生産されるので、培養物からジホモ-γ-リノレン酸を採取する。ジホモ-γ-リノレン酸は培養物よりそのまま採取してもよいが、培養物には炭素源として加えた油脂等が含まれるため、

加するクルクミンは、ウコン粉末またはクルクミン純品のいずれであってもよいが、不純物等の影響を考慮するとクルクミン純品の方が好ましい。クルクミンの添加量は培地1ℓあたり0.01～1.0g、好ましくは0.05～2gである。クルクミンの添加方法は、エタノールやジクロロメタンなどの適当な溶媒に溶解して添加することもできるが、培地の炭素源として用いる油脂に均一に混合して添加するのが好ましい。また、添加する時期は培養を始める前が好ましいが、培養途中から加えてもよい。

上記微生物を培養するための培地としては、炭素源、窒素源、無機塩類などを含むものが用いられる。炭素源としては、ブドウ糖、オリーブ油、サフラワー油、γ-リノレン酸含有油などの炭水化合物や油脂等が用いられる。ここでγ-リノレン酸含有油としては、月見草油、るりじさ油等の植物油；モルティエラ(*Mortierella*)属、ムコール(*Mucor*)属、カニングメラ(*Cunninghamella*)属等に属する糸状菌から抽出された微生物油があげ

培養物より菌体を分離し、この菌体からジホモ-γ-リノレン酸を採取するのが好ましい。ジホモ-γ-リノレン酸の採取は、溶媒抽出やクロマトグラフィーなどの常法により行なわれる。

次に、本発明の脂肪酸のΔ5位不飽和化反応抑制剤について説明する。本発明でいうΔ5位不飽和化反応とは、例えばジホモ-γ-リノレン酸からアラキドン酸への変換反応を指す。

本発明の脂肪酸のΔ5位不飽和化反応抑制剤は、クルクミンを主成分とするものである。その使用にあたっては、微生物や動物細胞に脂肪酸を加えたものにクルクミンを0.01～100mg/g乾燥菌体、好ましくは0.1～20mg/g乾燥菌体添加すればよく、これにより微生物や動物細胞の脂肪酸に対するΔ5位不飽和化反応を抑制することができる。

#### 〔実施例〕

次に、本発明を実施例により説明するが、本発明はこれらによって制限されるものではない。

## 比較例 1

第1表に示した組成の培地に炭素源として16%  $\gamma$ -リノレン酸含有油(オレイン酸40%, リノール酸10%,  $\gamma$ -リノレン酸16%)を30g/ℓ加えた培地を作製した。この培地100mlを500mlの三角フラスコに入れ、121℃で15分間滅菌処理した。このフラスコにコニディオボラス・ナノデス CBS 183/62 を接種し、30℃で4日間振とう培養した。

第1表 培地組成

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1 g
ペプトン	10 g
イーストエキストラクト	5 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01 g
蒸留水	1 ℓ

培養終了後、遠心分離により菌体を集菌し、リノ酸緩衝液(pH 7.0)を用いて洗浄した後、吸引ろ過により菌体を採取した。この菌体をアルミ

製のカップに入れ、ガラスビーズ、メタノール、クロロホルムを加えてホモジナイザーで菌体を破碎し、菌体内の脂質を抽出した。抽出した脂質をBF<sub>3</sub>-メタノールを用いてメチルエステル化して、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸組成を調べた結果を第2表に示す。

なお、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸の同定は以下の方法により行なった。ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸の標品と本サンプルを混合してキャピラリーガスクロマトグラフィー(カラム:PEG 20M)で分析したところ、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸画分のピークが大きくなった。また、本サンプルを硝酸銀含浸薄層クロマトグラフィーによりトリエン画分を分取した。この画分には $\gamma$ -リノレン酸とジホモ- $\gamma$ -リノレン酸が含まれていた。分取したトリエン画分から液体クロマトグラフィー(カラム:ODS)によりジホモ- $\gamma$ -リノレン酸を分取した。このジホモ- $\gamma$ -リノレン酸をピコリニル誘導体化し、キャピラリーガスマススペクトラムにより同定した。その結果、 $\Delta 8$ , 11, 14エ

イコサトリエン酸、すなわちジホモ- $\gamma$ -リノレン酸であることが確認された。

## 実施例 1

比較例1と同様の培地を作成し、これに第2表に示した所定量のクルクミンを添加した。添加方法は、所定量のクルクミンをエタノールに溶解したものを500mlフラスコに入れ、さらに16%  $\gamma$ -リノレン酸含有油3gを加え、窒素気流下でエタノールをとばしてクルクミンを油に混合した後、ここに第1表に示した培地を100ml加えて培地を作成した。この培地を滅菌後、コニディオボラス・ナノデス CBS183/62を接種し、30℃で4日間振とう培養した。培養終了後、比較例1と同様の方法で菌体内脂質の脂肪酸組成を分析した。この結果を第2表に示す。

第2表

	比較例 1	実施例 1			
		0.2	0.3	0.5	0.7
クルクミン添加量(g/ℓ)	0	0.2	0.3	0.5	0.7
菌体収量(g/ℓ)	22.0	27.0	30.6	27.9	16.4
油脂収量(g/ℓ)	6.8	8.3	11.16	8.5	5.1
脂肪酸組成(%)					
ミリスチン酸(C <sub>14:0</sub> )	1.1	—	0.9	—	—
パルミチン酸(C <sub>16:0</sub> )	24.1	—	24.6	—	—
ステアリン酸(C <sub>18:0</sub> )	4.1	—	3.2	—	—
オレイン酸(C <sub>18:1</sub> )	27.0	—	26.3	—	—
リノール酸(C <sub>18:2</sub> )	6.1	—	5.7	—	—
$\gamma$ -リノレン酸(C <sub>18:3</sub> )	6.3	—	4.0	—	—
エイコサトリエン酸(C <sub>20:3</sub> )	3.0	—	4.3	—	—
ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸(C <sub>20:3</sub> )	4.1	8.2	15.7	16.1	14.0
アラキドン酸(C <sub>20:4</sub> )	15.7	8.9	9.6	4.2	4.6
ヘン酸(C <sub>22:0</sub> )	3.2	—	3.3	—	—
その他	5.3	—	2.4	—	—
ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸 収量(g/ℓ)	—	0.54	1.76	1.37	0.72

第2表より明らかなように、クルクミンの添加によってジホモ- $\gamma$ -リノレン酸の含有率が顕著に上昇し、アラキドン酸の含有率が相対的に低下しており、 $\Delta 5$ 位不飽和化反応が特異的に阻害されていることがわかった。

#### 実施例2および比較例2

第1表に示した培地にグルコース10g/lと16% $\gamma$ -リノレン酸油20g/lを加えた培地(比較例2)および前記比較例2の培地に実施例1と同様の方法によりクルクミン0.3g/lを加えた培地(実施例2)を作成し、121℃で15分間滅菌した。この培地にコニディオボラス・ナノデス CBS 183/62 を接種し、30℃で4日間振とう培養した。培養終了後、比較例1と同様の方法で菌体内脂質の脂肪酸組成を分析した。この結果を第3表に示す。

第3表

菌体収量 (g/l)	油脂収量 (g/l)	ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸含有率(%)	ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸収量(g/l)	77:13- $\gamma$ -リノレン酸含有率(%)	77:13- $\gamma$ -リノレン酸収量(g/l)
比較例2	17.1	5.5	3.8	0.21	31.1
実施例2	13.8	5.6	8.9	0.46	26.8
					1.70
					1.49

#### 実施例3

第1表に示した培地の3倍濃度の培地に16% $\gamma$ -リノレン酸含有油を90g/l加え、さらにクルクミンを実施例1と同様の方法により0.5g/l加えた培地を作成した。この培地6lを10lジャーファメンターに入れ、121℃で15分間滅菌した。次いで、コニディオボラス・ナノデス CBS 183/62を第1表に示した培地に16% $\gamma$ -リノレン酸含有油30g/lを加えた培地600mlで前培養したものを、上記ジャーファメンターに全量接種し、30℃で4日間通気攪拌培養した。培養終了後、比較例1と同様の方法で菌体内脂質の脂肪酸組成を分析した。その結果、アラキドン酸含有率は10%、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸含有率は15%、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸収量は培地1lあたり3.3gであった。

#### 実施例4

実施例1において、添加したクルクミン量を0.7g/lとしたことおよび接種した微生物をコニディオボラス・ランブラウジェス ATCC 12585 とし

たこと以外は実施例1と同様の操作を行なった。その結果、菌体収量は20.3g/l、油脂収量は6.0g/l、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸含有率は9.0%、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸収量は0.54g/l、アラキドン酸含有率は8.8%であった。実施例5、6および比較例3、4

第1表に示した培地に16% $\gamma$ -リノレン酸含有油30g/l添加した培地(比較例3、4)、第1表に示した培地に16% $\gamma$ -リノレン酸含有油30g/lおよびクルクミン0.5g/l添加した培地(実施例5、6)を作成し、これらの培地にモルティエラ・アルビナ IF0 8568 またはモルティエラ・エロンガータ IF0 8570 を接種し、20℃で第4表に示した所定日数振とう培養した。培養終了後、比較例1と同様の方法で菌体内脂質の脂肪酸組成を分析した。この結果を第4表に示す。

第4表

	接種した 菌名	培養日数 (日)	菌体収量 (g/l)	ジホモ-γ-リノレン酸 含有率(%)	アラキドン酸 含有率(%)
比較例3	モルティエラ・アルビダ IFO 8568	15	18.7	0.4	1.1
実施例5	モルティエラ・アルビダ IFO 8568	15	13.2	1.9	1.3
比較例4	モルティエラ・エロンガータ IFO 8570	10	17.3	0.8	2.3
実施例5	モルティエラ・エロンガータ IFO 8570	10	14.1	1.8	0.2

表より明らかなように、モルティエラ属微生物を用いた場合においてもアラキドン酸よりもジホモ-γ-リノレン酸含有率の高い油脂を得ることができた。

(発明の効果)

本発明によれば、微生物菌体内のアラキドン酸含有率を下げ、ジホモ-γ-リノレン酸含有率を上げることができるので、ジホモ-γ-リノレン酸を効率よく安価に大量生産できる。また、本発明によれば脂肪酸のΔ5位不飽和化反応を低コストに抑制することができる。得られたジホモ-γ-リノレン酸は医薬、生化学用試薬として有用である。

特許出願人 出光石油化学株式会社

代理人 弁理士 久保田 藤 郎

